

열 대류를 이용한 염기서열 증폭 방법 및 장치기술분야

5           본 발명은, 염기서열(nucleic acid sequences)을 증폭하는 장치 및 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 열 대류를 이용하여 염기서열을 증폭하는 장치 및 방법에 관한 것으로, 온도 조절에 의하여 DNA 또는 RNA와 같은 유전자 시료의 특정 부위 염기서열을 증폭하는 공정들, 즉 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)을 포함한 염기서열 증폭 공정들을 실행할 수 있는 방법 및 장치에 관한 것이다.

10

배경기술

          염기서열 증폭기술은 생명과학, 유전공학, 및 의학 분야 등의 연구 개발 및 진단 목적으로 광범위하게 활용되고 있으며, 특히 중합효소 연쇄반응에 의한 염기서열 증폭기술  
15   (이하 "PCR 염기서열 증폭기술"이라 한다)이 널리 활용되고 있다. 상기 PCR 염기서열 증폭기술에 관한 상세한 내용은, 미합중국 특허 제4,683,202호, 제4,683,195호, 제4,800,159호, 및 제4,965,188호에 기재되어 있다.

          PCR 염기서열 증폭기술을 자동화하여 여러 종류의 유전자 시료들을 보다 효율적  
20   으로 빠른 시간 안에 증폭하기 위한 다양한 장치 및 방법들이 개발되어 사용되고 있는데, 그 기본적인 작동원리는 다음과 같다.

          상용화된 PCR 염기서열 증폭기술에서는, 증폭될 주형 DNA(template DNA), 주형 DNA의 각 단일가닥의 특정 서열과 상보적인 서열을 가지는 올리고뉴클레오티드  
25   (oligonucleotide) 프라이머(primer) 쌍, 고온 안정성 DNA 중합효소(thermostable DNA polymerase), 및 dNTP(deoxynucleotide triphosphates)를 포함한 시료를 준비하고, 이

시료의 온도를 순차적으로 변화시키는 온도 사이클을 반복함으로써 주형 DNA의 특정 부위 염기서열을 증폭한다. 구체적으로 3단계 또는 2단계의 온도 순환 사이클을 사용하는데, 온도 변화에 의하여 염기서열 증폭을 달성하는 과정은 다음과 같다.

첫 번째 단계는 디내추레이션 단계(denaturation step)로서, 상기 시료를 고온으로 가열시킴으로써 이중가닥 DNA를 단일가닥 DNA로 분리하는 단계이다. 두 번째 단계는 어닐링 단계(annealing step)로서, 상기 디내추레이션 단계를 거친 시료를 적정 온도로 냉각시킴으로써, 상기 단일가닥 DNA와 상기 프라이머가 이중나선 결합을 하여 부분적으로 이중가닥이 된 DNA-프라이머 복합체(DNA-primer complex)를 형성하는 단계이다. 세 번째 단계는 폴리머리제이션 단계(polymerization step)로서, 상기 어닐링 단계를 거친 시료를 적정 온도로 유지시킴으로써 상기 DNA-프라이머 복합체의 프라이머를 DNA 중합효소가 중합반응에 의해 연장(extension)하여 원래의 주형 DNA에 대하여 상보적인 서열을 가지는 새로운 단일가닥 DNA를 복제하는 단계이다. 이와 같은 세 가지 단계를 순차적으로 20 내지 40 회 정도 반복하여 매 사이클마다 상기 두 개의 프라이머 사이의 염기서열이 복제되게 함으로써 수백만 배 또는 그 이상에 이르는 염기서열 증폭을 달성하게 된다.

15

상기 디내추레이션 단계에서의 온도는 90℃에서 94℃ 범위의 값을 주로 사용하며, 상기 어닐링 단계에서의 온도는 사용된 프라이머의 녹는 점, 즉  $T_m$  값에 따라 적절하게 조절하는데, 통상적으로 35℃에서 65℃ 범위의 값을 사용한다. 폴리머리제이션 단계에서의 온도는 주로 사용하는 *Thermus aquaticus*로부터 추출한 고온 안정성 Taq DNA 중합효소의 최적 활성 온도인 72℃로 맞추어, 3단계 온도 순환 사이클을 사용하는 것이 가장 보편적이며, Taq DNA 중합효소의 활성 온도 범위가 상당히 넓으므로 상기 어닐링 단계와 폴리머리제이션 단계의 온도를 같게 하여 온도를 순환하는 2단계 온도 사이클도 사용하고 있다.

25 종래에 가장 보편적으로 많이 사용하는 방식은 반응용기를 열전도성이 높은 금속 고체블록과 열적으로 접촉시킨 상태에서, 상기 금속 고체블록을 가열장치 및 냉각장치와

결합시켜 온도를 변화시킴으로써 시료의 온도 순환 사이클을 달성하는 방식이다. 이러한 방식의 상용화된 장치로 온도 변화 시간을 단축시키기 위하여 열전도성이 아주 높은 금도금이 된 은 블록(Gold-plated silver block)을 사용하거나, 펠타이어(Peltier) 냉각법을 채용한 제품 등이 상용화되어 시판되고 있다. 최근 들어 금속 고체블록을 열원으로 사용하는 대신, 기체 또는 액체와 같은 유체를 열원으로 대체하여, 적정 온도로 가열된 유체를 시료가 들어 있는 반응용기와 효율적으로 접촉할 수 있게 순환시켜 온도 변화 시간을 상당히 단축할 수 있는 기술들이 개발되어 제품화되고 있다. 또한, 시료가 들어 있는 반응용기 또는 시료 자체를 특정 온도로 유지된 열원들과 순차적으로 접촉하게 이동시키는 방식, 적외선을 사용하여 시료를 직접 가열하는 방식 등 시료의 온도 변화 사이클을 효율적으로 짧은 시간 안에 달성하기 위한 다양한 방법들이 개발되고 있다.

상기 종래의 염기서열 증폭 장치는, 시료 전체의 온도를 3단계 또는 2단계 온도 순환 사이클에 따라 변화시키므로 다음과 같은 문제점이 존재한다.

첫째, 종래의 온도 사이클형 염기서열 증폭 장치는 시료의 온도를 바꾸는 공정이 반드시 필요하므로 구성이 복잡하다. 시료 전체의 온도를 바꾸는 공정을 수행하기 위해서, 상기 금속 고체블록 또는 유체와 같은 열원의 온도를 변화시키는 방식은 열원의 온도를 조절하여 빠르고 고르게 변화시키는 수단과 온도변화의 간격을 조절하는 수단이 반드시 필요하며, 상기 반응용기 또는 시료를 특정 온도의 열원과 순차적으로 접촉하게 이동시키는 방식은 반응용기 또는 시료를 빠르고 정확하게 이동시키는 수단과 이동시간을 조절하는 수단이 반드시 필요하기 때문이다.

둘째, 종래의 염기서열 증폭 장치는 이러한 복잡한 구성으로 인하여 복합장치 및 소형화된 소자에 구현하는 것이 쉽지 않다. 최근의 생명공학에서는, 포토리소그래피(photolithography)를 사용하여 유리, 실리콘, 또는 고분자 기관 위에 시료가 이동하는 채널을 비롯하여 밸브, 압력계, 반응용기, 검출장치 등을 하나의 장치로 집적시킨 랩온어칩

(Lab-on-a-chip)과 같은 소형화된 복합장치들을 개발하고 있으며, 이러한 소형화 또는 복합화된 장치들은 연구용 및 의학적 목적의 다양한 활용도를 가질 것으로 기대되고 있다. 염기서열 증폭반응을 수행하는 장치를 이와 같은 소형화된 칩 상에서 구현하는 경우, 시료 전체의 온도를 변화시키는 공정을 반드시 필요로 하는 종래의 염기서열 증폭 방식은 그 구성상의 복잡성으로 인하여 소형화에 불리한 방식이며, 또한 급격한 온도 변화가 바람직하지 않은 복합장치에서의 구현도 어렵다.

셋째, 종래의 염기서열 증폭 장치는 *Taq* DNA 중합효소와 같은 고온 안정성을 가진 DNA 중합효소만을 사용할 수 있다. 종래의 염기서열 증폭 장치는 시료 전체를 고온으로 바꾸는 공정을 포함하고 있기 때문이다.

넷째, 종래의 염기서열 증폭 장치는 PCR 반응시간을 단축시키는데 한계가 있다. 종래의 염기서열 증폭 장치는 시료 전체의 온도를 바꾸기 위한 공정이 반드시 필요하기 때문에 적어도 온도가 변화되는 시간만큼 PCR 반응시간이 늘어나게 된다.

### 발명의 개시

본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해서 안출된 것으로서, 시료 내에 서로 온도가 다른 복수의 특정 온도의 영역을 형성시키고 상기 복수의 특정 온도의 영역간의 온도 기울기로부터 기인하는 자연적인 열 대류 현상에 의해 각 온도 영역간의 시료의 순환이 일어나게 함으로써 염기서열 증폭을 달성하는, 새로운 개념의 열 대류 방식의 염기서열 증폭 방법 및 장치를 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

본 발명은 종래의 온도 순환 사이클 방식에서 반드시 필요한 온도 변화를 조절하여 일으키는 수단과 온도 변화의 간격을 조절하는 수단 등의 복잡한 구성 요소를 필요로 하지 않는, 보다 구성적으로 간단한 열 대류 방식의 염기서열 증폭방법 및 장치를 제공하

는 것을 또 다른 목적으로 한다.

따라서, 본 발명은 종래의 장치 및 방법에 비하여 구성적으로 간단한 염기서열 증  
폭장치 및 방법을 개발함으로써 장치의 소형화 및 랩온어칩과 같은 복합장치에서의 구현이  
5 용이한 방법 및 장치를 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

또한, 본 발명은 고온 안정성을 가진 DNA 중합효소 뿐만 아니라 고온 안정성을  
가지지 않은 DNA 중합효소도 사용할 수 있는 열 대류 방식의 염기서열 증폭 방법 및 장  
치를 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

10

그리고, 본 발명은 시료의 온도 변화공정을 없앴으로써 보다 효율적인 염기서열 증  
폭 방법 및 장치를 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

본 발명이 속한 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 명세서의 도면, 발명의  
15 상세한 설명 및 특허청구범위로부터 본 발명의 다른 목적 및 장점을 쉽게 인식할 수 있다.

상기와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명은 다음과 같은 새로운 작동원리에 근  
거한 열 대류 방식의 염기서열 증폭 방법 및 장치를 제공한다.

20 상기와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명은, 중합효소 연쇄반응을 이용하는 염기  
서열 증폭 방법에 있어서,

증폭하고자 하는 특정 염기서열을 포함한 주형 DNA, DNA 중합효소, 삼인산화 데  
옥시아데노신, 삼인산화 데옥시시티딘, 삼인산화 데옥시구아노신, 삼인산화 데옥시티미딘,  
및 상기 특정 염기서열 부위의 3'말단에 각각 상보적인 염기서열을 가지는 최소 두 개 이  
25 상의 올리고핵산 프라이머를 포함하는 시료를 반응용기에 주입하는 단계;

상기 시료 내의 복수의 특정 영역에 열을 공급하거나 또는 열을 빼앗는 복수의 열

원을 열적으로 결합시키되, 상기 시료 내의 복수의 특정 영역 중 상대적으로 높은 온도로 유지되는 영역이 상대적으로 낮은 온도로 유지되는 영역보다 낮은 높이에 위치하도록 상기 열원을 배치시킴으로써, 특정의 공간적 온도 분포를 시료 내에 유지시키는 단계; 를 포함 하되,

- 5           상기 특정의 공간적 온도 분포는 i) 이중가닥 DNA를 단일가닥 DNA로 분리하는 디내츄레이션 단계, ii) 상기 단일가닥 DNA가 상기 프라이머와 DNA-프라이머 복합체를 형성하는 어닐링 단계, iii) 상기 DNA-프라이머 복합체의 프라이머를 중합반응에 의하여 연장하는 폴리머리제이션 단계가 일어날 수 있는 온도 조건을 가진 공간적 영역들을 포함 하며, 열 대류에 의한 시료의 순환에 의하여 상기 디내츄레이션 단계, 어닐링 단계, 폴리머
- 10   리제이션 단계를 순차적이고 반복적으로 발생시키는 온도 분포인 것을 특징으로 하는 염기 서열 증폭 방법을 제공한다.

또한 상기와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명은, 중합효소 연쇄반응을 이용하는 염기서열 증폭 장치에 있어서,

- 15           시료 내의 복수의 특정 영역에 대하여 열을 공급하거나 또는 열을 빼앗는 복수의 열원을 포함하며,

상기 복수의 열원은 상기 시료 내의 복수의 특정 영역 중 상대적으로 높은 온도로 유지되는 영역이 상대적으로 낮은 온도로 유지되는 영역보다 낮은 높이에 위치하도록 배치 됨으로써 특정의 공간적 온도 분포를 시료 내에 유지시키며,

- 20           상기 특정의 공간적 온도 분포는 i) 이중가닥 DNA를 단일가닥 DNA로 분리하는 디내츄레이션 단계, ii) 상기 단일가닥 DNA가 상기 프라이머와 DNA-프라이머 복합체를 형성하는 어닐링 단계, iii) 상기 DNA-프라이머 복합체의 프라이머를 중합반응에 의하여 연장하는 폴리머리제이션 단계가 일어날 수 있는 온도 조건을 가진 공간적 영역들을 포함 하며, 열 대류에 의한 시료의 순환에 의하여 상기 디내츄레이션 단계, 어닐링 단계, 폴리머
- 25   리제이션 단계를 순차적이고 반복적으로 발생시키는 온도 분포인 것을 특징으로 하는 염기 서열 증폭 장치를 제공한다.

본 발명에서는 먼저, 시료가 담긴 반응용기 내에 디내츄레이션 단계, 어닐링 단계, 및 폴리머리제이션 단계가 순차적이고 반복적으로 일어날 수 있는 온도 조건을 가진 공간적 영역을 형성시킨다. 이를 달성하기 위하여, 상기 시료 내의 복수의 특정 영역에 대하여

5 열을 공급하거나 또는 열을 빼앗는 복수의 열원을 배치시키는데, 상기 시료 내의 복수의 특정 영역 중 상대적으로 높은 온도로 유지되는 영역이 상대적으로 낮은 온도로 유지되는 영역보다 낮은 높이에 위치하도록 상기 열원을 배치시킨다. 그 결과, 상기 복수의 특정 온도의 영역간의 온도 기울기로부터 기인하는 자연적인 열 대류 현상에 의하여 각 온도 영역간의 시료의 순환이 일어나게 되고, 그에 의하여 디내츄레이션, 어닐링, 폴리머리제이션의

10 세 단계가 순차적으로 그리고 반복적으로 일어나게 됨으로써, 염기서열이 증폭되게 된다.

상기의 원리에 입각한 열 대류 방식의 염기서열 증폭 방법인 본 발명은, 그 장치의 구성에 있어서 다음과 같은 특징을 가진다. 첫째, 반응용기 내 시료의 복수의 특정 영역들을 선택된 온도상태로 유지할 수 있는 복수의 열원을 필요로 한다. 둘째, 상기 복수의 특정 온도 영역들 사이의 시료의 순환이 열 대류에 의해 일어나게 하기 위하여, 상대적으로 높은 온도의 영역이 상대적으로 낮은 온도의 영역보다 낮은 높이에 위치하도록 하여야 한다. 즉, 고온 영역에서의 시료가 상대적으로 낮은 밀도를 가지게 되므로, 이로 인한 부력의 작용에 의하여 낮은 높이에 위치한 고온 영역에서 높은 높이에 위치한 저온 영역으로의 부력에 의한 시료의 이동 및 중력의 영향에 의한 반대 방향으로의 시료의 이동이 유발됨으로써 온도차에 의한 자연적인 열 대류에 의해 상기 복수의 특정 온도 영역간의 시료의 순환이 자연적으로 일어나게 하여야 한다. 셋째, 상기 복수의 특정 영역의 온도는 디내츄레이션, 어닐링, 폴리머리제이션의 세 단계가 일어날 수 있는 공간적 영역이 시료 내에 형성되도록 선택되어야 하며, 동시에 열 대류에 의해 적절한 속도의 시료의 순환이 서로 다른 온도 영역간에 일어남으로써 상기 세 단계가 순차적이고 반복적으로 실행될 수 있도록 선택되어야 한다.

25

상술한 목적, 특징 및 장점들은 첨부된 도면과 관련한 다음의 상세한 설명을 통하여 보다 분명해 질 것이다. 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

## 5 도면에 관한 간단한 설명

도1은 본 발명에 따른 열 대류 방식의 염기서열 증폭 방법의 작동원리를 보여 주는 모식도,

도2a 및 도2b는 시료 내에 세 개 이상의 특정 온도 영역을 형성하는 경우의 모식도,

도3a 및 도3b는 본 발명에 따른 염기서열 증폭 장치의 단면도와 사시도,

도4는 높이에 따른 반응용기 내 시료의 온도 분포도,

도5는 실시예 1의 결과를 반응시간에 따라서 보여주는 전기 영동사진,

도6은 실시예 2의 결과를 프라이머 쌍별로 보여주는 전기 영동사진,

도7은 실시예 3의 결과를 반응시간에 따라서 보여주는 전기 영동사진이다.

<도면의 주요 부분에 대한 부호의 설명>

1, 1': 고온 영역

2, 2': 저온 영역

3, 4, 3', 4': 열원

5: 대류 영역

6: 반응용기

101: 제 1 전도성 블록

102: 제 2 전도성 블록

103: 반응용기

104: 가열장치



105: 온도 조절 유체 유입부

106: 온도 조절 유체 유출부

107: 단열재

112, 117: 관통구

5 111: 개구부

### 발명의 최선의 실시예

이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명에 따른 바람직한 실시예를 상세히 설명한다.

10

도1은, 본 발명에 따른 열 대류 방식의 염기서열 증폭 방법의 작동원리를 보여 주는 모식도이다. 도1에 보인 모식도의 경우는 한 쪽이 막힌 일자형 튜브를 반응용기로 사용하고, 시료 내에 두 개의 특정 온도 영역(1, 2)을 형성하는 경우를 특정하여 예시하고 있으나, 도2의 예들에서 보인 바와 같이 변형된 모양의 반응용기를 사용하거나, 세 개 이상의 특정 온도 영역을 형성하는 등의 다양한 변형예가 가능함은 아래에 기술한 본 발명의 열 대류 방식의 염기서열 증폭방법의 작동원리에 비추어 볼 때 통상적인 지식의 범주 내에서 자명하다고 할 것이다.

15

도1에 도시한 바와 같이 반응용기에 들어 있는 시료 내의 2개의 특정 영역(1, 2)에 직접적으로, 또는 반응용기의 벽을 통하여 간접적으로 열을 공급하거나 빼앗아 가는 2개의 열원(3, 4)을 열적으로 결합시킴으로써 시료 내에 공간적 온도 분포를 형성시켜 디내추레이션, 어닐링, 폴리머리제이션의 중합효소 연쇄반응에 필요한 세 가지 단계가 일어날 수 있는 공간적 온도 분포가 형성되게 한다. 상기 2개의 온도가 다른 특정 영역(1, 2) 중 상대적으로 온도가 높은 영역(1)이 상대적으로 온도가 낮은 영역(2)보다 낮은 높이에 위치하게 함으로써, 온도차로부터 기인하는 시료의 밀도차를 발생시켜 고온 영역(1)의 낮은 밀도의 시료가 받는 부력과 저온 영역(2)의 높은 밀도의 시료가 받는 중력에 의해 자연적으로 시

20

25

료의 열 대류가 발생하여 디내츄레이션, 어닐링, 폴리머리제이션 세 가지 반응 단계가 일어나는 공간 영역들 간에 시료의 순환이 자연적으로 일어나게 한다. 이와 같은 구성에 의하여 상기 세 가지 중합효소 연쇄반응의 단계들이 순차적으로 반복적으로 일어나게 하는 것이 가능하며, 이에 따라 중합효소 연쇄반응에 의한 DNA 염기서열이 증폭을 달성할 수

5 있다. 보다 구체적으로 작동 상태를 예시하면 다음과 같다.

예를 들어, 시료의 하층부에 위치한 특정 고온 영역(1)의 온도를 이중가닥 DNA를 단일가닥 DNA로 분리할 수 있는 온도 조건인 90 내지 94℃로 유지함으로써 디내츄레이션 단계가 이 특정 고온 영역에서 주로 일어나게 한다. 그리고, 시료의 상층부에 위치한

10 특정 저온 영역(2)의 온도를 프라이머의 어닐링 온도 영역인 35 내지 65℃로 유지하여 하층부의 특정 고온 영역에서 디내츄레이션된 DNA가 열 대류에 의해 상층부의 특정 저온 영역으로 이동하게 함으로써 단일가닥 DNA와 이에 상보적인 염기서열을 갖는 프라이머가 어닐링되어 DNA-프라이머 복합체를 형성하게 한다. 이러한 구성 하에서, 72℃에서 최적 활성도를 가지고 낮은 온도 영역까지 넓은 활성도를 가지는 것으로 알려진 *Taq* DNA 중합

15 효소를 중합반응을 위하여 사용하는 경우, DNA-프라이머 복합체에 DNA 중합효소가 결합하여 프라이머를 연장 (extention)하게 되는 폴리머리제이션 단계는 특정 저온 영역(2) 및 대류 영역(5)의 상층부에서 일어나게 된다. 따라서, 상기 특정 고온 영역(1)에서 상기 디내츄레이션 단계가 일차적으로 일어나고, 디내츄레이션된 DNA가 프라이머 존재 하에서 열 대류에 의해 상기 특정 저온 영역(2)으로 이동함으로써 어닐링 단계가 이차적으로 일어나

20 게 되며, 어닐링에 의해 생성된 DNA-프라이머 복합체가 DNA 중합효소의 존재 하에서 열 대류에 의해 상기 특정 저온 영역(2)과 대류 영역(5)을 통과하는 과정 중에 마지막으로 상기 폴리머리제이션 단계가 일어나게 되며, 이에 따라 상기 디내츄레이션, 어닐링, 폴리머리제이션의 중합효소 반응의 3 단계가 순차적으로, 그리고 반복적으로 일어나게 되어 시료 DNA의 특정 부위 염기서열의 증폭을 효율적으로 달성하게 된다.

25

도2에 도시한 바와 같이 반응용기에 들어 있는 시료 내의 3개의 특정 영역에 복수

의 열원을 열적으로 결합시킨 구성도 가능하다. 도2a는 두 개의 고온 영역(1, 1')과 하나의  
 저온 영역(2)을 형성시키도록 복수의 열원(3, 3', 4)을 배치시키는 구성을 나타내는 모식도  
 이며, 도2b는 하나의 고온 영역(1)과 두 개의 저온 영역(2, 2')을 형성시키도록 복수의 열  
 원(3, 4, 4')을 배치시키는 구성을 나타내는 모식도이다. 이 때 사용되는 상기 복수의 열원  
 5 들은 구성의 목적에 따라 상기 특정 영역 별로 각각 배치되거나 또는 동일한 열원이 병용  
 될 수 도 있다. 도2a의 경우, 상기 두 개의 고온 영역(1, 1')이 각각 중합효소 연쇄반응 중  
 디내처레이션 단계와 폴리머리제이션 단계가 일어나도록 구성된다면, 상기 복수의 열원 역  
 시 각각 그 단계에 가장 적합한 온도를 유지시키는 열원을 배치하여야 한다. 도2b의 경우,  
 상기 두 개의 저온 영역(2, 2')이 모두 중합효소 연쇄반응 중 어닐링 단계가 일어나도록 구  
 10 성한다면, 상기 복수의 열원 중 두 가지(4, 4')는 동일한 열원을 병용하는 것이 더 바람직  
 할 것이다. 또한, 도2b에 나타낸 모식도는, 본 발명의 방법에 의하여 시료의 유입부와 유  
 출부가 분리된 반응용기의 구성이 가능함을 보여주고 있다.

본 발명의 효율을 향상시키기 위해서는, 각 단계의 반응이 충분히 일어나면서도 전  
 15 체 반응시간을 단축시킬 수 있도록 열 대류의 속도를 적절하게 조절하는 것이 중요하다.  
 이는 a) 상기 특정 온도 영역간의 온도 기울기의 조절, b) 상기 반응용기의 내경의 조절,  
 및 c) 상기 반응용기의 재질의 변화 등을 통하여 달성할 수 있다. 열 대류 속도의 조절을  
 위하여 온도 기울기를 조절하는 방법으로는, 상기 특정 온도 영역 사이의 온도 차이를 조  
 절하는 것이 가장 쉬우나, 중합효소 연쇄반응의 경우 상기 특정 온도 영역이 가지는 기능  
 20 으로 인하여 그 온도 차이의 조절이 제한적일 수밖에 없다. 그러므로, 상기 특정 고온 영  
 역(1, 1')과 상기 특정 저온 영역(2, 2') 사이의 거리를 변화시켜서 동일한 효과를 얻게 되  
 는데, 같은 온도 차이를 가지는 상기 특정 온도 영역 사이의 길이가 길수록 온도 기울기가  
 작아지고, 따라서 열 대류 속도가 감소하게 된다. 반응용기의 벽면과 시료 사이의 접착력  
 (adhesion force)에 의한 저항력 역시 시료의 대류를 저해하는 요인이므로, 반응용기의 내  
 25 경을 조절하여 열 대류의 속도를 조절할 수 있다. 시료와 접촉되는 반응용기의 표면적이  
 시료의 부피에 대비하여 클수록 상기 접착력에 의한 저항력이 증가하여 상기 열 대류의 속

도가 감소하게 된다. 따라서, 반응용기의 내경을 조절함으로써 시료와 접촉되는 반응용기의 표면적을 조절하여 상기 열 대류의 속도를 조절할 수 있다. 시료와 반응용기의 벽면과의 접촉력은 또한, 반응용기의 재질과도 밀접한 관계를 가지고 있다. 중합효소 연쇄반응은 수용액에서 진행되므로, 유리 등 친수성 재질에 비하여 폴리에틸렌, 폴리프로필렌 등 물과  
 5 의 접촉력이 약한 소수성 재질의 반응용기를 사용할 때 대류의 속도는 증가한다. 따라서 중합효소 연쇄반응의 반응속도론적 조건에 맞도록 상기의 조건들을 조합하여 반응용기를 구성함으로써, 본 발명의 효율을 더욱 향상시킬 수 있다.

도3은, 본 발명에 따른 염기서열 증폭 장치 중 실시예에 따른 단면도(3a) 및 사시  
 10 도(3b)를 보여준다. 도3에 도시된 염기서열 증폭 장치는 가열장치; 또는 냉각장치; 또는 가열장치 및 냉각장치와 같은 온도 유지 수단을 포함하는 복수의 열원으로 구성된다. 바람직하게는 상기 복수의 열원 사이를 열적으로 차단시키는 단열 수단을 포함하여 구성될 수 있다. 본 실시예는, 시료의 특정 영역과 열적으로 결합되는 제 1 열원과 제 2 열원으로 구성  
 15 되어 있다. 상기 제 1 열원은 열전도성 블록인 제 1 전도성 블록(101)과 제 1 전도성 블록에 열을 공급하는 장치인 전열방식의 가열장치(104)로 구성되어 있으며, 반응용기의 하부에 열적으로 접촉하여 시료의 하층부에 고온 영역을 형성하도록 구성되어 있다. 상기 제  
 2 열원은 열전도성 블록인 제 2 전도성 블록(102)과 제 2 전도성 블록 내부에 적정 온도의 물을 순환시켜 제 2 전도성 블록을 적정 온도로 유지시키는 순환형 항온 수조로 구성  
 20 되어 있으며, 상기 제 2 전도성 블록(102)은 반응용기의 상부에 열적으로 접촉하여 시료의 상층부에 저온 영역을 형성하도록 구성되어 있다. 상기 제 2 전도성 블록(102)은 항온 수조로부터 물을 받아들이는 유입부(105), 상기 유입된 물을 유출하는 유출부 (106), 상기 유입부(105)로 유입된 물을 제 2 전도성 블록(102) 내부로 순환시키기 위한 유체순환로를 포함하고 있으며, 상기 제 2 전도성 블록(102) 내의 유체 순환로는 도3에는 도시되어 있  
 25 지 않지만, 상기 제 2 전도성 블록(102)에 열을 고르게 전달하도록 구성되어 있다는 것을 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 알 수 있다. 상기 전도성 블록(101, 102)의 재질은 열 전도성이 좋은 구리를 사용하였으며, 상기 제 1 전도성 블록(101)과 상

기 제 2 전도성 블록(102)간의 직접적인 열교환을 차단시키기 위해서 양 블록 사이에 단열재(107)가 삽입되어 있다. 그리고, 상기 제 1 전도성 블록(101)과 상기 제 2 전도성 블록(102)은 반응용기를 수용하기 위한 수용부를 가지고 있는데, 상기 수용부는, 상기 제 1 전도성 블록(101)의 한쪽이 막힌 개구부(111)와, 상기 제 2 전도성 블록(102)의 관통구(112)와, 상기 단열재(107)의 관통구(117)에 의해 형성된 오목부로 구성되어 있다.

후술하는 <실시예 1>, <실시예 2>, 및 <실시예 3>에서는, 시료의 하층부의 고온 영역이 94℃가 되도록 상기 전열방식 가열장치(104)의 가열 정도를 조절하였고, 시료의 상층부의 저온 영역이 45℃가 되도록 순환형 항온 수조의 물의 온도를 조절하였다.

10

본 발명은 도3에 도시된 염기서열 증폭 장치에 한정되는 것은 아니며, 다음과 같은 변형예가 있을 수 있다.

첫째, 상기 전도성 블록(101, 102)의 구성을 변형할 수 있다. 예를 들면, 제 1 전도성 블록(101)은 반응용기의 하부와 열적으로 접촉시키고, 제 2 전도성 블록(102)은 반응용기의 상부와 열적으로 접촉시키되 반응용기의 중간 부분을 공기와 접하도록 하거나, 제 3의 전도성 블록을 사용하여 반응용기의 중간 부분과 열적으로 접촉시킬 수도 있다. 또한, 도3의 경우와 달리 상기 복수의 전도성 블록으로부터 반응용기의 벽을 통하여 시료의 특정 영역으로 열이 전달되게 하는 대신, 시료와 상기 전도성 블록이 직접 열적으로 접촉하게 하는 구성도 가능하다.

둘째, 상기 전도성 블록의 재질을 변형할 수 있다. 도3의 실시예에서는 구리로 된 전도성 블록(101, 102)을 사용하였지만, 이에 한정되는 것은 아니며 반응용기에 열을 전달할 수 있는 물질은 어떠한 것이라도 가능하다. 예를 들면, 다른 전도성 고체나, 액체 또는 기체와 같은 유체를 상기 전도성 블록과 대체하여 사용할 수 있으며, 시료의 특정 영역을 적외선 등을 사용하여 직접 가열하는 방법을 사용함으로써 전도성 블록(101, 102)의 일부

또는 전부를 사용하지 않을 수 있다.

셋째, 도3에서 제 1 전도성 블록과 제 2 전도성 블록의 온도를 유지하는 온도 유지 수단이 순환형 항온 수조나 전열 방식의 가열장치에 한정되는 것은 아니며, 적절한 양의 열을 공급하거나 빼앗아 갈 수 있는 것은 어떠한 것이라도 사용 가능하다.

넷째, 도3의 단열부재(107) 대신 고체, 액체, 또는 기체 등 전도물질간의 열을 차단시키는데 적합한 어떠한 수단도 사용할 수 있으며, 상기 단열부재를 사용하지 않는 구성도 가능하다.

10

다섯째, 도1에서 사용된 반응용기 대신에 열 대류가 용이하게 일어나도록 변형된 반응용기(예를 들면 도2a, 도2b와 같은 반응용기)를 사용하는 경우, 본 발명의 사상에 적합하게 변형된 상기 전도성 블록 및 그 변형예를 포함한 복수의 열원을 구성하여 사용할 수 있다.

15

상기 첫째, 둘째, 및 셋째의 경우는 열원의 구성 중 그 일부분을 변형한 예로서 특히 전도성 블록을 변형한 경우이다. 본 명세서에서 열원은 시료를 특정의 온도 범위로 유지시키는 수단을 통칭하며, 따라서, 상술한 열원의 변형예 외에도 시료의 특정 영역을 특정 온도로 유지시킬 수 있는 기능을 가진 장치라면 어떠한 구성이라도 본원 발명에서 열원으로써 사용될 수 있다. 시료의 특정 영역을 특정 온도로 유지시킬 수 있는 기능을 가진 장치라면 어떠한 구성도 본원 발명의 범위에 포함되는 것이며, 본원 발명의 특징이 열원의 구체적인 구성에 있는 것이 아니고 시료내에서 중합효소 연쇄반응이 순차적이고 반복적으로 수행될 수 있는 공간적인 온도 분포를 만들기 위해서 열원을 특이하게 배치시킨 점에 있기 때문이다.

25

상기 변형예들의 보다 구체적인 구성은 산업 현실에 따라서 다양하게 변형될 수

있는 것이므로, 더 상세한 설명은 생략한다.

도4는 반응용기 내의 시료의 반응용기 바닥으로부터의 높이에 따른 온도 분포도로  
서, 열 대류를 이용하여 PCR 반응이 일어나는 원리를 보여준다. 열 대류 (thermal  
5 convection)는 유체가 온도차에서 비롯된 밀도차로 자연적으로 이동하는 현상이다. 특히  
이를 자연대류(natural convection)라 하며, 이는 펌프나 프로펠러 등을 이용하여 강제로  
유체를 이동시키는 강제대류(forced convection)와는 구별된다. 본 명세서에서의 대류는  
모두 자연대류를 의미한다. 반응용기 내에서 자연대류가 발생하기 위해서는, 반응용기내  
시료의 상층부의 온도보다 하층부의 온도가 높아야 된다.

10

도4에서 알 수 있듯이, 반응용기의 하부와 접촉하는 제 1 전도성 블록(101)을  
96℃로 유지하고 반응용기의 상부와 접촉하는 제 2 전도성 블록(102)을 45℃로 유지시킨  
경우에, 반응용기 내의 시료에는 고온 영역(도4에서 90℃ 이상 영역), 저온 영역(도4에서  
50℃ 부근의 영역), 및 대류 영역(도4에서 온도의 기울기가 존재하는 영역)이 형성된다. 상  
15 기 고온 영역에서 시료는 주로 디내츄레이션 단계를 거치고, 상기 디내츄레이션 단계를 거  
친 시료는 대류 영역을 통하여 상기 저온 영역으로 이동되어 어닐링 단계를 거치게 되며,  
시료가 상기 저온 영역에 있는 동안과 저온영역으로부터 대류 영역으로 돌아오는 동안 폴  
리머리제이션 단계를 거치게 된다. 열 대류에 의한 상기 3 개 영역간의 시료의 순환에 의  
하여, 상기 3 가지 단계가 순차적이고 반복적으로 수행됨으로써 중합효소 연쇄반응에 의한  
20 염기서열 증폭이 달성되게 된다.

도7은 고체의 표면에 고정화한 DNA 중합효소를 사용한 결과를 보여주고 있다. 본  
명세서에서, 고정화한 DNA 중합효소라 함은 고체 상에 활성을 유지한 채 결합되어 있는  
DNA 중합효소를 의미한다. 고정화한 DNA 중합효소를 제조하는 방법은 여러 가지가 있을  
25 수 있으나, 중합효소 연쇄반응의 결과로 주형 DNA의 염기서열이 증폭되어 그 결과를 검  
출할 수 있을 정도로 활성이 높게 유지된 고정화한 DNA 중합효소를 제조할 수 있어야 한

다. 본 발명에서 사용된 고정화한 DNA 중합효소는, DNA 중합효소의 활성부위를 DNA 기질로 마스킹하여 금 표면 위에 공유결합에 의해 고정화시키는 방법으로 활성이 높게 유지된 채로 제조하였다. 본 명세서의 실시 예에 그 구체적인 과정이 설명되어 있는데, 본 발명에서 실시한 결과, 고정화된 효소의 활성은 동량의 용액상 효소에 비하여 약 60 - 80%의 수준을 나타내어 중합효소 연쇄반응에 사용할 수 있을 정도의 충분한 활성을 나타내었다. 그러나, 본 발명에서 사용되는 고정화된 DNA 중합효소는 상기 방법에 의하여 고정화된 것에만 국한되는 것이 아니고 다른 방법으로 고정화된 DNA 중합효소라도 사용될 수 있다.

열 대류 방식의 염기서열 증폭 방법인 본 발명에서는 DNA 중합효소를 사용함에 있어서, *Taq* 중합효소 등 고온 안정성 효소를 사용하는 외에 클레나우 프래그먼트(Klenow fragment) 나 T7 DNA 중합효소와 같이 고온 안정성을 가지지 않은 효소도 사용할 수 있다. 이는 본 발명의 특성상 전체 시료의 온도가 고온과 저온으로 반복적으로 변화하는 것이 아니라, 시료내 특정 영역 별로 온도가 유지되기 때문이다. 즉, 시료의 하층부는 계속 고온 영역으로 유지되는 반면, 시료의 상층부는 계속 저온 영역으로 유지되고 있으므로, 이러한 저온 영역 또는 저온 영역에 가까운 대류 영역의 상층부에 DNA 중합효소를 고정화함으로써, 고온 안정성을 가지지 않은 효소의 사용이 가능하게 된다.

본 발명인 염기서열 증폭 장치를 사용하여, 본 발명의 목적을 달성할 수 있다는 것을 다음의 실시예 1, 2, 및 3을 통하여 확인하였다.

## <실시예 1>

### 1. 방법

#### 1.1 반응용기



반응용기로서 한쪽이 막힌 유리관을 사용하였으며, 유리관의 길이는 55~60 mm이고, 내경은 2 mm이고, 외경이 8 mm이며, 막힌 쪽 바닥 면의 유리 두께는 약 3 mm이다. 유리관 내벽은 스프레이 방식의 폴리테트라플루오로에틸렌 (Polytetrafluoroethylene) 코팅제로 코팅하고 열경화시켜 표면 처리하여 사용하였다.

5

## 1.2 시료

pBluescript II KS(+)를 주형 DNA로 사용하였다. PCR 반응에 사용된 시료는 주형 DNA가 40 ng, T3 프라이머(5'-ATTAACCCTCACTAAAG-3')(서열식별기호:1) 및 T7 프라이머(5'-AATACGACTCACTATAG-3')(서열식별기호:2)가 각각 40 pmol씩 포함되어 있고, 4 nmol의 dNTP 혼합물질, 1 pmol (5 U)의 *Taq* DNA 중합효소(*Taq* DNA polymerase), 그리고 250 nmol 염화마그네슘, 50 mM의 염화칼륨이 포함된 전체 부피 100  $\mu$ l인 pH 8.3의 10 mM 트리스 완충용액이 되도록 제조하여 사용하였다.

10

## 1.3 반응온도와 반응시간

먼저 제 1 전도성 블록(101)은 전열 방식 가열 장치를 가열하여 96℃로 유지하였고, 제 2 전도성 블록(102)은 순환형 항온 수조를 사용하여 45℃로 유지하였다. 상기의 반응용기에 상기의 방법으로 준비한 시료를 주입하여 수용부(111, 117, 112)에 끼워 넣고, 적정 시간 동안 반응시켰다. 이때, 반응용액이 끓는 것을 방지하기 위해 질소 기체를 가하여 1.2 기압 정도의 압력을 유지하였다.

20

## 1.4 반응용기 내 시료의 온도 분포 측정

상기의 반응 조건에서 반응용기 내 시료의 각 영역에 대한 온도를 측정하였다. 열전쌍(thermocouple)을 이용하는 온도계의 열전쌍 끝이 반응용기 바닥에서부터 2.5 mm 씩 상승하는 곳에 위치하도록 담그고, 충분한 시간이 경과한 후 온도를 측정하여 기록하였다.

반응용기 내 시료의 온도 분포를 측정한 예는 도4에 도시된 바와 같다.

25

## 2. 결과

우선, 상기 반응 조건에서 반응용기 내 시료의 각 영역에서 온도 변화를 측정한 결과, 시료 내의 온도 분포는, 다내추레이션이 일어날 수 있도록 90℃ 이상이 유지되는 고온 영역, 어닐링이 일어날 수 있도록 50℃로 유지되는 저온 영역, 그리고, 그 사이에서 열 대류가 일어날 수 있도록 온도 기울기가 형성되는 대류 영역이 형성됨을 확인할 수 있었다 (도4 참조). 폴리머리제이션은 상기 저온 영역 및 대류 영역의 상층부에서 일어나게 될 것으로 예상할 수 있다.

상기 반응 조건에서 시료를 일정한 반응시간 동안 그대로 방치해 두었다가 반응용기를 꺼내어 식힌 다음, 반응 생성물을 1.0% 아가로스 젤(agarose gel)로 전기영동시켜 확인하였다. 도5는, 반응시간을 30분 간격으로 4시간까지 변화시키면서 얻은 결과를 보여주는 전기 영동사진이다. 반응 생성물은 164 bp의 이중나선 DNA이다. 도5에서 알 수 있듯이, 90분 이전에 PCR 반응이 포화되기 시작했음을 알 수 있다.

### <실시예 2>

#### 1. 방법

T3/T7 프라이머 쌍 외에 KS/U 프라이머 쌍, KS/*Pvu*II 프라이머 쌍, KS/*Nae*I 프라이머 쌍을 각각 사용하였다. 반응은 150분간 진행시켰으며, 나머지 방법은 상기 실시예 1의 방법과 동일하게 하였다. T3, T7 프라이머의 서열은 실시예 1에서 기술한 바와 같으며, 나머지 프라이머들의 서열은 다음과 같다.

KS 프라이머; 5'-CGAGGTCGACGGTATCG-3'(서열식별기호:3)

U 프라이머; 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'(서열식별기호:4)

*Pvu*II 프라이머; 5'-TGGCGAAAGGGGGATGT-3'(서열식별기호:5)

*Nae*I 프라이머; 5'-GGCGAACGTGGCGAGAA-3'(서열식별기호:6)

## 2. 결과

5

상기 실시예 1처럼, 전기영동법을 사용하여 반응 생성물을 확인하였다. 도6은 실시예 2의 결과를 보여주는 전기 영동사진으로 레인 1, 2, 3 및 4는 각각 T3/T7 프라이머 쌍, KS/U 프라이머 쌍, KS/*Pvu*II 프라이머 쌍, KS/*Nae*I 프라이머 쌍으로 증폭한 결과로서, 각각 164 bp, 144 bp, 213 bp, 413 bp의 크기가 맞는 이중나선 DNA가 생성됨을 확인할 수 있다.

10

### <실시예 3>

#### 1. 방법

15

시료에 *Taq* DNA 중합효소를 넣는 대신, *Taq* DNA 중합효소를 금 와이어 표면에 고정시키고 이를 저온 영역에 위치시켜서 실험하였다. 나머지 실험조건은 상기 실험 1의 조건과 동일하게 하였다.

20

DNA 중합효소를 금 와이어 표면에 고정시키는 방법은 다음과 같다.

25

아래에 나열된 65개 염기의 단일가닥 DNA와 KS 프라이머를 1:1 몰비로 넣은 pH 8.3의 인산염 완충용액을 94℃에서 10 분 동안 방치한 후, 35℃ 이하가 될 때까지 느린 속도로 냉각시킨다. 이때 65개 염기의 단일가닥 DNA와 KS 프라이머가 어닐링되어 부분적으로 이중가닥이 된 DNA가 생성되게 된다. 이 용액에 적정 몰수의 *Taq* DNA 중합효소 (AmpliTaq Gold, Perkin Elmer사, 미국)를 넣고, 72℃ 건조욕(dry bath)에서 10 분 동안

방치한 후 50℃ 건조육으로 옮겨서, DNA 중합효소의 활성부위에 상기 부분적 이중가닥 DNA가 결합되어 마스킹된 DNA 중합효소 용액을 제조하였다.

KS 프라이머: 5'-CGAGGTCGACGGTATCG-3'(서열식별기호:1)

5 65-mer: 3'-  
CCAGCTGCCATAGCTATTTTCTTTTCTTTCTTAAGTTCTTTTCTTTTCCTAGGTGA  
TCAAGATCT-5'(서열식별기호:7)

표면에 밀집하여 고정화되는 DNA 중합효소의 최대량이 0.26 pmol이 되도록, 4.7  
10 cm 길이의 지름 0.1 mm인 금 와이어(gold wire)를 외경 1.5 mm, 길이 약 4 mm의 나선  
형이 되도록 준비하였다. 표면 세척을 위하여 반응 직전에 60~70℃로 조절한 피란하  
(Piranha) 용액에 10~15 분 동안 넣어 두었다가, 탈이온수에 이어서 절대 에탄올로 세척  
하였다.

금 표면에 고정화 반응성 작용기를 도입하기 위하여 티올기를 가지고 있는 연결물  
15 질과 금 사이에서 일어나는 티올레이트 형성 반응, 즉 Au-S 결합 형성반응을 이용하여 금  
표면에 티올 분자 단층막을 도입하여 지지대를 형성시켰다. 이때 고정화 반응성 작용기와  
비반응성 말단기를 가지는 2가지 티올 분자가 혼합된 용액을 사용하여, 고정화 반응성 작  
용기를 가지는 티올 분자의 몰분율이 5%가 되도록 조절하였다. 고정화 반응성 작용기로  
카르복실기를 도입하기 위하여 알킬 사슬의 길이가 상대적으로 긴 티올 분자인 12-머캅토  
20 도데칸산을 연결물질로 사용하였고, 비반응성 말단기를 가지는 티올 분자인 6-머캅토-1-  
헥산을 또는 1-헵탄티올을 매트릭스 물질로 사용하였다. 총 티올 분자 농도 2 mM의 에탄  
올 용액 100  $\mu$ l에 금 와이어를 넣고 상온에서 2 시간 동안 반응시킨 후, 금 와이어를 건  
져내어 절대 에탄올로 세척함으로써, 금 와이어 표면에 카르복실기를 도입하였다.

25 카르복실기가 도입된 금 와이어를 10 mM의 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카  
르보디이미드(EDC)와 5 mM의 N-히드록시숙신이미드(NHS)를 포함하는 에탄올 용액 120

$\mu$ l에 넣어 상온에서 2 시간 동안 반응시켰다. 상기 카르복실기는 카르보다이미드의 존재 하에서 N-히드록시숙신이미드와 반응하여 NHS-에스테르를 형성함으로써 활성화된다.

티올 분자 단층막의 카르복실기를 활성화시킨 후 금 와이어를 건져내어 상기 DNA 중합효소의 활성화부위를 마스킹한 효소용액에 넣고 반응시켰다. 이 때, 티올 분자 단층막의  
5 활성화된 카르복실기(NHS-에스테르)와 단백질의 일차 아민기와의 반응에 의하여 아마이드 결합(-CO-NH-)이 형성되어, *Taq* DNA 중합효소가 지지대에 고정화된다.

## 2. 결과

10 상기 실시예 1처럼, 전기영동법을 사용하여 반응 생성물을 확인하였다. 도7은, 반응시간을 30분 간격으로 4시간까지 변화시키면서 얻은 결과를 보여주는 전기 영동사진이다. 도7에서 알 수 있듯이, 150분 이전에 PCR 반응이 포화되기 시작했음을 알 수 있다.

상기 <실시예 1>, <실시예 2>, 및 <실시예 3>의 결과를 통하여 다음과 같은 점을  
15 알 수 있다.

첫째, 본 발명인 열 대류를 이용한 염기서열 증폭 장치가 효과적으로 작동된다.

둘째, 본 발명인 열 대류를 이용한 염기서열 증폭 장치에서는, 저온 영역 또는 대  
20 류 영역의 상승부에 고체 표면에 고정된 DNA 중합효소를 위치시켜 PCR 반응을 수행할 수 있음을 확인함으로써, 고온에서 안정성을 갖지 않은 DNA 중합효소도 사용할 수 있음을 확인하였다.

이상에서 설명한 본 발명은 전술한 실시예 및 첨부된 도면에 의해 한정되는 것이  
25 아니고, 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 여러 가지 치환, 변형 및 변경이 가능하다는 것이 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서

명백하다. 그 때문에, 전술한 실시예와 변형예들은 모든 점에서 단순한 예시에 지나지 않으며, 한정적으로 해석되어서는 안된다. 본 발명의 범위는 특허청구범위에 의해서 나타나는 것으로서, 명세서 본문에 의해서는 아무런 구속도 되지 않는다.

5           상기한 바와 같이, 본 발명에서는 시료 내의 복수의 특정 영역들이 서로 다른 특정 온도로 유지되고 상기 특정 영역간의 열 대류에 의해 시료가 반응용기내에서 순환됨으로써 디내추레이션 단계, 어닐링 단계, 폴리머리제이션 단계가 순차적이고 반복적으로 수행될 수 있으므로, 다음과 같은 효과가 있다.

10           첫째, 염기서열 증폭 장치의 구성을 간단히 할 수 있다. 본 발명은, 시료의 온도를 변화시키는 공정이 필요 없기 때문에 종래의 염기서열 증폭 장치에서는 반드시 필요한 온도 변화 및 조절을 위한 복잡한 장치의 사용을 배제시킴으로써, 보다 간단하게 구성할 수 있다.

15           둘째, PCR 염기서열 증폭 공정을 수행하는 장치를 소형화하거나, 랩온어칩과 같은 복합장치에 집적시키기가 용이하며, 온도 변화가 바람직하지 않은 장치에도 사용할 수 있다.

          셋째, 고온 안정성을 가지지 않은 DNA 중합효소도 사용할 수 있다. 본 발명에서는,  
20   반응용기의 특정 영역을 DNA 중합효소가 활성화되는 온도로 유지시키고 DNA 중합효소를 활성화되는 온도 영역에 고정화하여 사용할 수 있기 때문이다. 본 발명에 따르면, 고정화된 DNA 중합효소를 사용할 경우 중합효소를 활성 온도에 고정시킨 채로 PCR 반응을 시킬 수 있으므로, 저온에서 최적 활성을 가지는 클레나우 프래그먼트(Klenow fragment) 나 T7 DNA 중합효소와 같은 효소도 PCR 반응에 사용할 수 있다.

25

          넷째, PCR 반응 시간을 단축시킬 수 있다. 본 발명에서는, 시료 전체의 온도를 변

화시킬 필요가 없으므로, 온도 변화 및 조절을 위하여 소모되는 시간을 절약할 수 있다.

청구의 범위

1. 중합효소 연쇄반응을 이용하는 염기서열 증폭 방법에 있어서, 증폭하고자 하는 특정 염기서열을 포함한 주형 DNA, DNA 중합효소, 삼인산화 데옥시아데노신, 삼인산화 데옥시시티신, 삼인산화 데옥시구아노신, 삼인산화 데옥시티미딘, 및 상기 특정 염기서열 부위의 3'말단에 각각 상보적인 염기서열을 가지는 최소 두 개 이상의 올리고핵산 프라이머를 포함하는 시료를 반응용기에 주입하는 단계;

상기 시료 내의 복수의 특정 영역에 열을 공급하거나 또는 열을 빼앗는 복수의 열원을 열적으로 결합시키되, 상기 시료 내의 복수의 특정 영역 중 상대적으로 높은 온도로 유지되는 영역이 상대적으로 낮은 온도로 유지되는 영역보다 낮은 높이에 위치하도록 상기 열원을 배치시킴으로써, 특정의 공간적 온도 분포를 시료 내에 유지시키는 단계; 를 포함하되,

상기 특정의 공간적 온도 분포는 i) 이중가닥 DNA를 단일가닥 DNA로 분리하는 디내츄레이션 단계, ii) 상기 단일가닥 DNA가 상기 프라이머와 DNA-프라이머 복합체를 형성하는 어닐링 단계, iii) 상기 DNA-프라이머 복합체의 프라이머를 중합반응에 의하여 연장하는 폴리머리제이션 단계가 일어날 수 있는 온도 조건을 가진 공간적 영역들을 포함하며, 열 대류에 의한 시료의 순환에 의하여 상기 디내츄레이션 단계, 어닐링 단계, 폴리머리제이션 단계를 순차적이고 반복적으로 발생시키는 온도 분포인 것을 특징으로 하는 염기서열 증폭 방법.

2. 제 1 항에 있어서, 상기 열원 중 적어도 하나의 열원은 상기 반응용기 또는 상기 시료의 특정 영역에 열적으로 접촉되는 열전도성 고체; 및 상기 열전도성 고체에 대하여 열을 공급하는 가열장치 또는 열을 빼앗는 냉각장치 또는 상기 가열장치와 상기 냉각장치; 를 포함하는 것을 특징으로 하는 염기서열 증폭 방법.

3. 제 1 항에 있어서, 상기 열원 중 적어도 하나의 열원은 상기 반응용기의 특정 영역에 열적으로 접촉되는 액체; 상기 액체를 수용하는 수용부; 및 상기 액체에 대하여 열을 공급하는 가열장치 또는 열을 빼앗는 냉각장치 또는 상기 가열장치와 상기 냉각장치; 를



포함하는 것을 특징으로 하는 염기서열 증폭 방법.

4. 제 3 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 열원은 상기 액체를 반응용기 주위로 순환시키는 순환장치를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 염기서열 증폭 방법.

5. 제 1 항에 있어서, 상기 열원 중 적어도 하나의 열원은 상기 반응용기의 특정 영역에 열적으로 접촉되는 기체; 상기 기체에 대하여 열을 공급하는 가열장치 또는 열을 빼

앗는 냉각장치 또는 상기 가열장치와 상기 냉각장치; 및 상기 기체를 상기 반응용기 주위로 순환시키는 순환장치; 를 포함하는 것을 특징으로 하는 염기서열 증폭 방법.

6. 제 1 항에 있어서, 상기 열원 중 적어도 하나의 열원은 상기 시료에 직접 열을 공급하는 적외선 발생장치임을 특징으로 하는 염기서열 증폭 방법.

10 7. 제 1 항에 있어서, 상기 복수의 열원 사이를 열적으로 차단시키는 단열수단을 사용하는 것을 특징으로 하는 염기서열 증폭 방법.

8. 중합효소 연쇄반응을 이용하는 염기서열 증폭 장치에 있어서, 시료 내의 복수의 특정 영역에 대하여 열을 공급하거나 또는 열을 빼앗는 복수의 열원을 포함하며,

상기 복수의 열원은 상기 시료 내의 복수의 특정 영역 중 상대적으로 높은 온도로 유지되는 영역이 상대적으로 낮은 온도로 유지되는 영역보다 낮은 높이에 위치하도록 배치됨으로써 특정의 공간적 온도 분포를 시료 내에 유지시키며,

상기 특정의 공간적 온도 분포는 i) 이중가닥 DNA를 단일가닥 DNA로 분리하는 디내츄레이션 단계, ii) 상기 단일가닥 DNA가 상기 프라이머와 DNA-프라이머 복합체를 형성하는 어닐링 단계, iii) 상기 DNA-프라이머 복합체의 프라이머를 중합반응에 의하여 연장하는 폴리머리제이션 단계가 일어날 수 있는 온도 조건을 가진 공간적 영역들을 포함하며, 열 대류에 의한 시료의 순환에 의하여 상기 디내츄레이션 단계, 어닐링 단계, 폴리머리제이션 단계를 순차적이고 반복적으로 발생시키는 온도 분포인 것을 특징으로 하는 염기서열 증폭 장치.

25 9. 제 8 항에 있어서, 상기 열원 중 적어도 하나의 열원은 상기 반응용기 또는 상기 시료의 특정 영역에 열적으로 접촉되는 열전도성 고체; 및 상기 열전도성 고체에 대하여

열을 공급하는 가열장치 또는 열을 빼앗는 냉각장치 또는 상기 가열장치와 상기 냉각장치;  
를 포함하는 것을 특징으로 하는 염기서열 증폭 장치.

10. 제 8 항에 있어서, 상기 열원 중 적어도 하나의 열원은 상기 반응용기의 특정 영역에 열적으로 접촉되는 액체; 상기 액체를 수용하는 수용부; 및 상기 액체에 대하여 열을  
5 공급하는 가열장치 또는 열을 빼앗는 냉각장치 또는 상기 가열장치와 상기 냉각장치; 를 포함하는 것을 특징으로 하는 염기서열 증폭 장치.

11. 제 10 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 열원은 상기 액체를 반응용기 주위로 순환시키는 순환장치를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 염기서열 증폭 장치.

12. 제 8 항에 있어서, 상기 열원 중 적어도 하나의 열원은 상기 반응용기의 특정 영역에 열적으로 접촉되는 기체; 상기 기체에 대하여 열을 공급하는 가열장치 또는 열을 빼  
10 앗는 냉각장치 또는 상기 가열장치와 상기 냉각장치; 및 상기 기체를 상기 반응용기 주위로 순환시키는 순환장치; 를 포함하는 것을 특징으로 하는 염기서열 증폭 장치.

13. 제 8 항에 있어서, 상기 열원 중 적어도 하나의 열원은 상기 시료에 직접 열을 공급하는 적외선 발생장치임을 특징으로 하는 염기서열 증폭 장치.

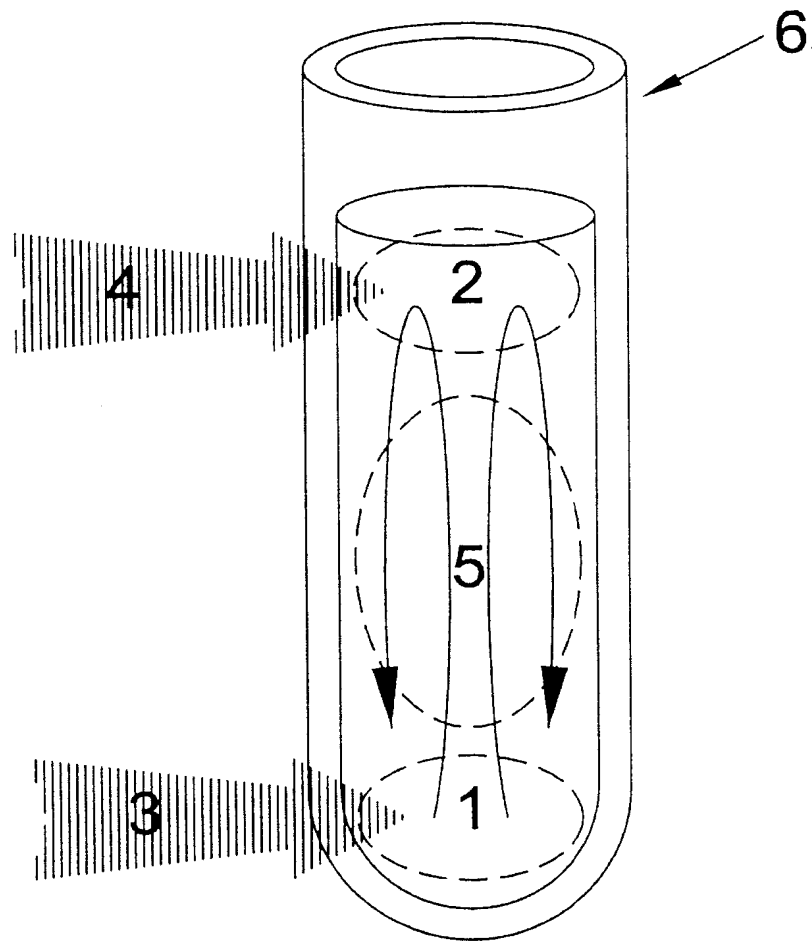
15 14. 제 8 항에 있어서, 상기 복수의 열원 사이를 열적으로 차단시키는 단열수단을 사용하는 것을 특징으로 하는 염기서열 증폭 장치.

요약서

본 발명은 구성이 간단하고, 소형화 및 복합장치에서의 구현이 용이하고, 고온 안정성이 아  
5   닌 DNA 중합효소도 사용할 수 있는 열 대류를 이용한 염기서열 증폭 장치 및 방법을 제  
공한다. 본 발명은 상기 시료 내의 복수의 특정 영역에 열을 공급하거나 또는 열을 빼앗는  
복수의 열원을 열적으로 결합시키되, 상기 시료 내의 복수의 특정 영역 중 상대적으로 높  
은 온도로 유지되는 영역이 상대적으로 낮은 온도로 유지되는 영역보다 낮은 높이에 위치  
하도록 상기 열원을 배치시킴으로써, 중합효소 연쇄반응이 효율적으로 일어날 수 있는 특  
10   정의 공간적 온도 분포를 시료 내에 유지시키는 단계를 포함한다.

1/5

Fig. 1



2/5

Fig. 2a

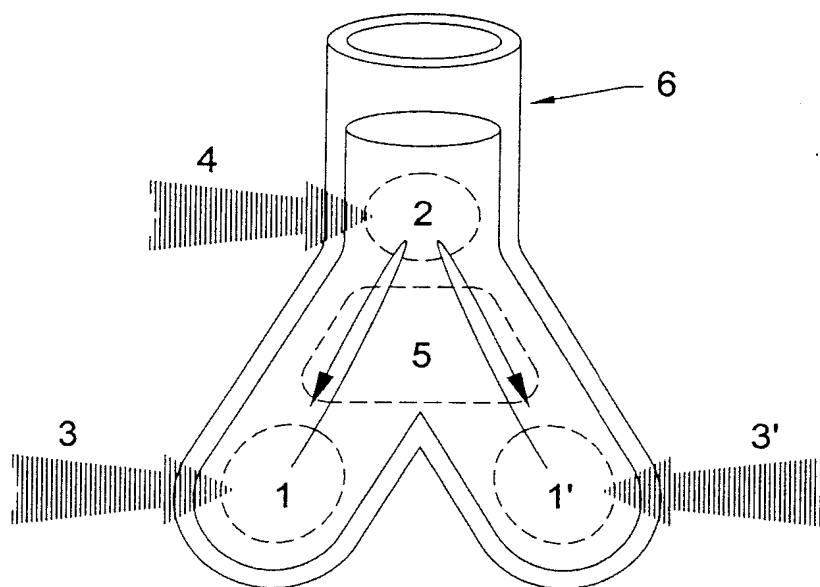
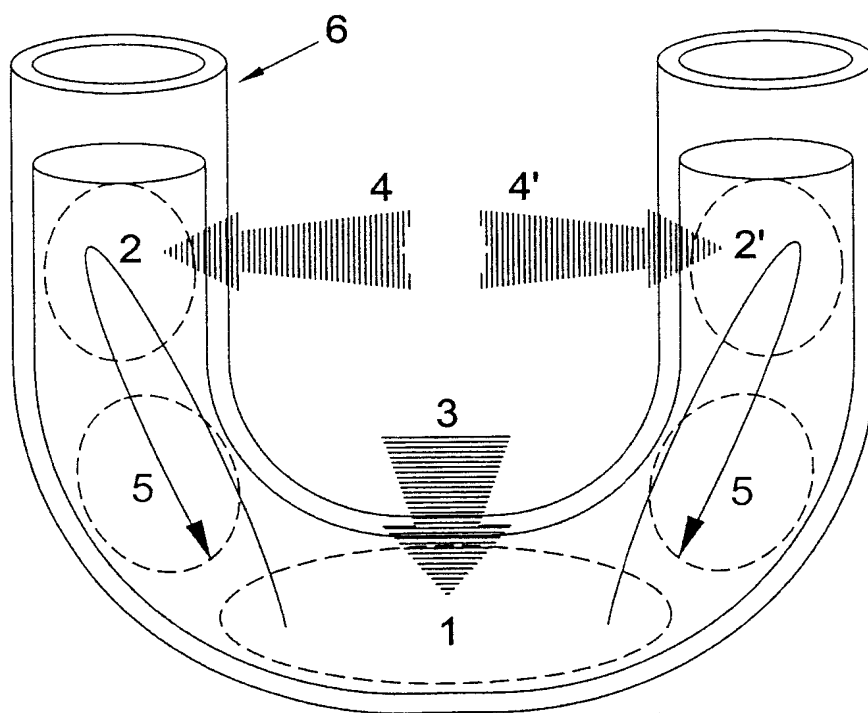


Fig. 2b



3/5

Fig. 3a

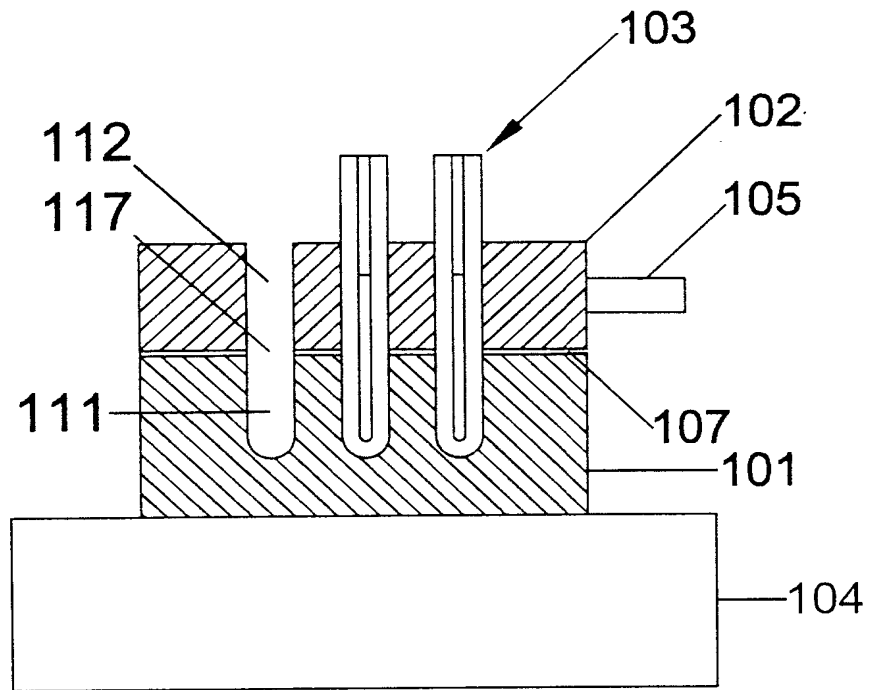


Fig. 3b

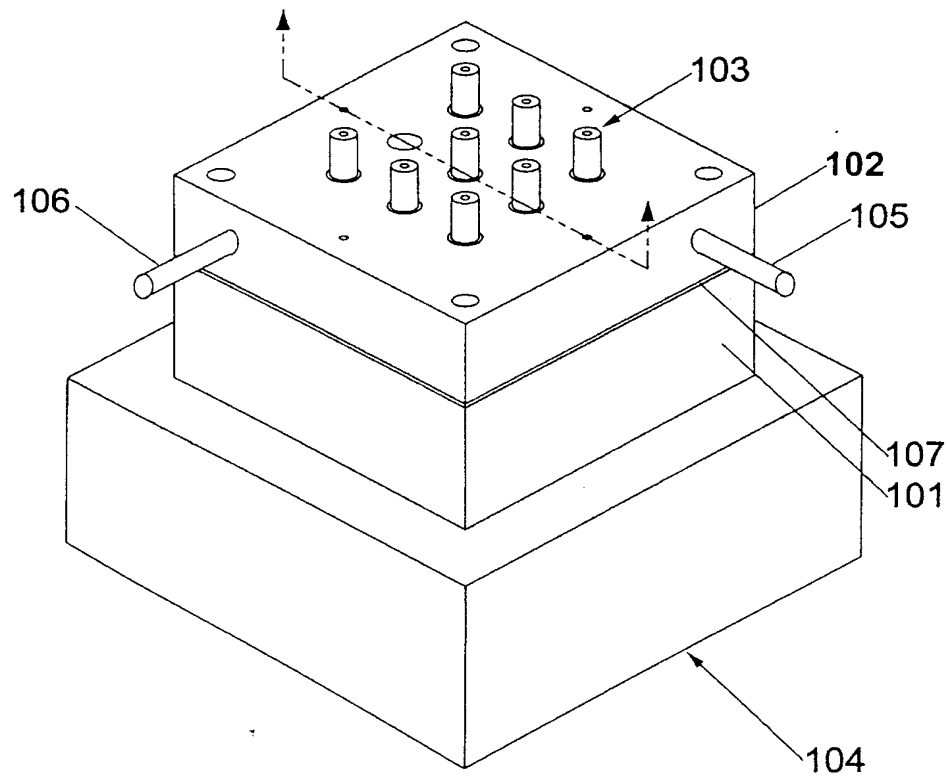
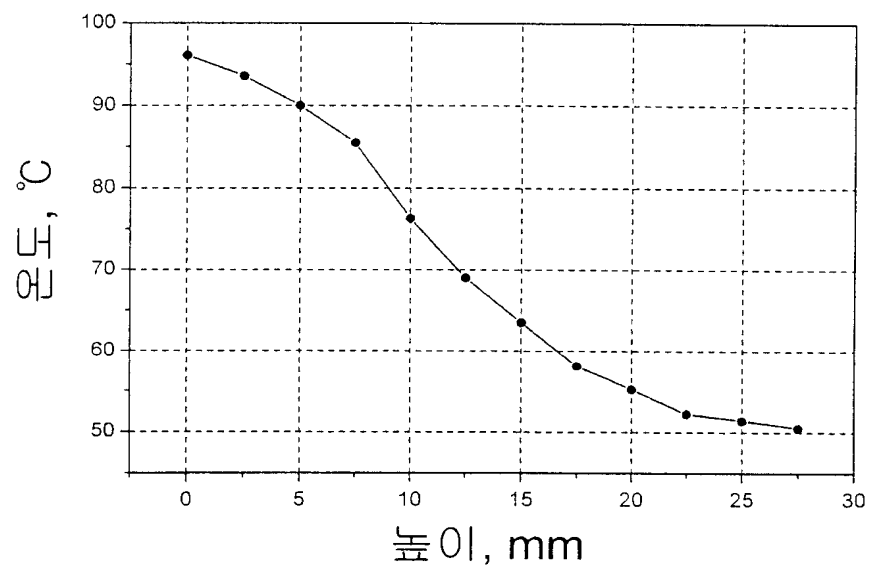
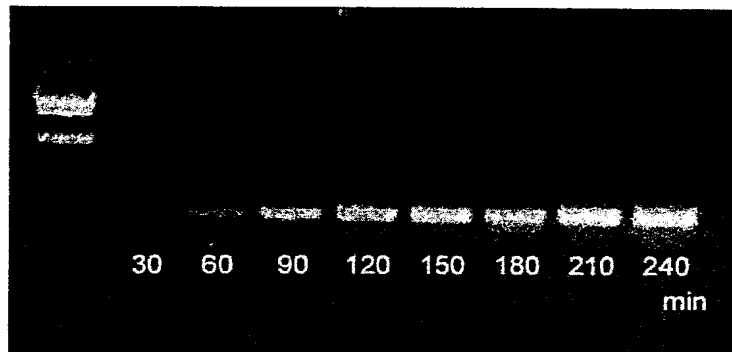


Fig. 4

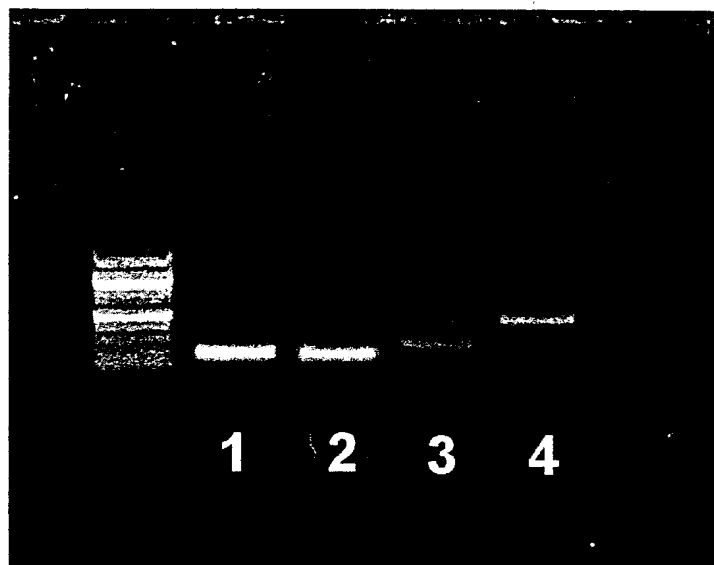


5/5

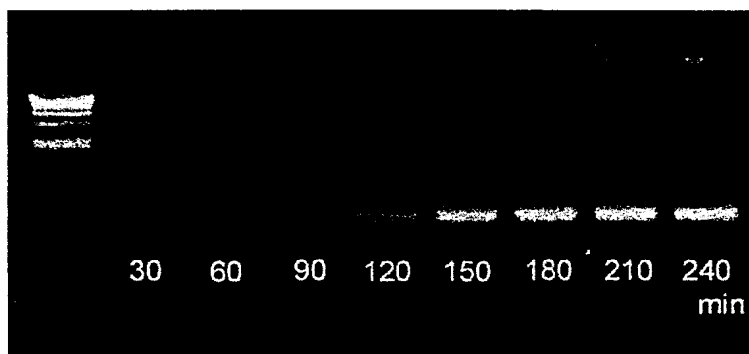
**Fig. 5**



**Fig. 6**



**Fig.7**





# Sequence Listing

---

<110> AHRAM BIOSYSTEMS INC.  
HWANG, HYUN JIN  
KIM, JEONG HEE  
JEONG, KYUNGHOON

<120> METHOD AND APPARATUS FOR AMPLIFICATION OF NUCLEIC ACID SEQUENCES  
BY USING THERMAL CONVECTION

<130> apa21\_kr\_pct

<150> KR-10-2001-0057040

<151> 2001-09-15

<150> KR-10-2001-0066943

<151> 2001-10-30

<160> 7

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence

<400> 1

attaaccctc actaaag

17

<210> 2

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic sequence

# Sequence Listing

---

<400> 2  
aatacgactc actatag 17

<210> 3  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic sequence

<400> 3  
cgaggctcgac ggtatcg 17

<210> 4  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic sequence

<400> 4  
gtaaaacgac ggccagt 17

<210> 5  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic sequence

## Sequence Listing

---

<400> 5  
tggcgaaagg gggatgt 17

<210> 6  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic sequence

<400> 6  
ggcgaacgtg gcgagaa 17

<210> 7  
<211> 65  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic sequence

<400> 7  
tctagaacta gtggatcctt ttcttttctt gaattctttc ttttctttta tcgataccgt 60

cgacc 65



PCT/KR02/01728

2002.09.14

수리관청 ( 정혜영 )

담	당	사	문	관
2002. 10. 7		박		
2002. 10. 7		7		

## 국 제 출 원 수 수 료 납 부 서

국 제 출 원 번 호				국제출원일		우선일	2000. 10.04
출 원 인	성 명	아람 바이오시스템 주식회사 외3인		주민등록번호		국 적	
	주 소	서울특별시 동대문구 장안3동 464-1 장안빌딩 405호					
대 리 인	성 명	김동진	대리인코드	9-2001- 000322-5	전화번호	(02) 2247- 6521	
	주 소	서울특별시 동대문구 장안3동 464-1 장안빌딩 405호					
납 부 수 수 료		<input checked="" type="checkbox"/> 송달료 <input checked="" type="checkbox"/> 기본료 <input checked="" type="checkbox"/> 지정료 <input checked="" type="checkbox"/> 조사료					
납 부 금 액		₩1,252,000원					

특허법시행규칙 제106조의5의 규정에 의하여 위와 같이 제출합니다.

2002년      09월      14일

대리인  
김동진



특 허 청 장 귀 하

※ 첨부서류

1. Fee Calculation Sheet 3통
2. 대리인에 의하여 절차를 밟는 경우에는 그 대리권을 증명하는 서류 1통

50285-17922민

99. 6. 2. 개정승인

210mm×297mm  
(보존용지2종 70g/m<sup>2</sup>)